

学 位 論 文 の 要 旨

※ 整理番号		ふ り が な 氏 名	くればやし ひでたか 呉 林 秀 崇
学位論文題目	Prokineticin 2 (PROK2) is an important factor for angiogenesis in colorectal cancer (大腸癌において Prokineticin 2 (PROK2)は血管新生の重要な因子である)		
<p>【目的】</p> <p>近年、本邦を含め世界的に大腸癌の発生率は増加傾向にあり、最も多い再発形式は血行性転移で、その転移に対する治療が生存率の改善に大きく関与している。また血行性転移において血管新生因子は重要な誘発因子の1つであり、現在複数の分子標的薬が開発され予後の改善が認められているが、その治療効果は未だ十分とはいえず、新規治療の開発が必要である。</p> <p>今回検討した Prokineticin2(PROK2)は消化管蠕動運動に関わる因子として注目され、その後の研究にてステロイドホルモンの産生促進、心臓や内分泌腺組織における血管新生、サーガディアンリズムなど種々のホメオスタシスの役割を有すると考えられている。今回我々は大腸癌における PROK2 の血管新生増殖因子としての可能性を検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>1. 大腸癌細胞株である LoVo、colo320、SW480、DLD-1、HT29、HCT116を用いて、当科で作製した PROK2 の特異的プライマーを用いて、RT-PCRを行い、大腸癌細胞株における PROK2 mRNA の発現を検討した。</p> <p>2. 1. の結果から得られた低 PROK2 mRNA 発現型大腸癌細胞株である DLD-1、HCT116、HT29 に pcDNA3-GFP-PROK2 ベクターを導入し、蛍光顕微鏡および RT-PCR 法にて発現を検討した。なお、empty ベクターを導入したものをコントロールとした。</p> <p>3. 2. で作製した細胞を3日間培養して、その培養液をミリポアチャンバー内に注入し、マウスの皮下に移植した(Dorsal sac method)。7日後にマウスの皮下における血管新生について、抗 CD31 抗体を用いた免疫組織化学染色法にて検討した。</p> <p>4. 2. で作製した細胞をマウスの皮下に移植し、3 週後の腫瘍部における血管新生ならびに腫瘍増殖について検討した。</p> <p>5. 高 PROK2 mRNA 発現大腸癌細胞株である LoVo、colo320 に SiRNA(control)と SiRNA(PROK2)を導入し、3 日後の培養液と細胞を用いた Dorsal sac method ならびに各細胞を皮下移植し、血管新生と腫瘍増殖について検討した。</p> <p>【結果】</p> <p>1. 大腸癌細胞株 6 細胞中、3 細胞に PROK2 mRNA 発現が認められ、そのバンドをシークエンスして PROK2 mRNA と確認した。</p> <p>2. 蛍光顕微鏡および RT-PCR 法にて PROK2 遺伝子挿入した細胞において pcDNA3-GFP-PROK2 が導入されたことを確認した。</p> <p>3. 低 PROK2 mRNA 発現型大腸癌細胞株に empty ベクターを挿入したコントロール群と比較し、PROK2 群では血管径が増大した。またコントロール群における抗 CD31 抗体による染色陽性細胞数は DLD-1、HCT116、HT29</p>			

でそれぞれ、7.1cells/HPF、12.1、9.8 であり、PROK2 群では 16.8、30.9、23.0 と染色細胞数が有意に増加した。

4. 腫瘍における抗 CD31 抗体による染色陽性細胞数はコントロール群では 7.25cells/HPF、2.75、2.44 であり、PROK2 群では 20.25、22.75、21.88 と有意に増加した。また腫瘍の大きさは、コントロール群では DLD-1、HCT116、HT29 でそれぞれ、26.4 mm³、98.0、23.5 であったのに対して、PROK2 群では 73.6、201.4、86.3 と有意に増大した。

5. 高 PROK2 発現型大腸癌細胞株(LoVo、colo320)への SiRNA(PROK2)の導入により肉眼的に血管新生が抑制され、抗 CD31 抗体による染色陽性細胞数は、SiRNA(control)導入では 19.8cells/HPF、20.5 であったが、SiRNA(PROK2)導入で 8.4、8.8 と有意に減少した。また腫瘍の大きさは SiRNA(control)では 176.5mm³、225.9、SiRNA(PROK2)では 38.1、13.7 と有意に抑制された。

【考察】

PROK2 は、染色体 3p21.1 に位置するとされ、消化管蠕動運動に加え、ステロイドホルモンの産生、内分泌腺や心臓における血管新生、神経細胞新生、サーガディアンリズムの調整に関与するとされる。これまでに消化管悪性腫瘍と PROK2 の関係性について考察した報告例はなく、我々は悪性腫瘍の中でも発生率の高い大腸癌において、PROK2 の働きを検討した。今回の検討にて、多くの大腸癌細胞株において PROK2 mRNA の発現が認められ、さらに PROK2 遺伝子が大腸癌に導入することにより、血管新生や腫瘍の増大も確認された。大腸癌において VEGF は血管新生因子としてよく知られている物質であるが、PROK2 因子とはアミノ酸配列にホモロジーを認めないことから異なる蛋白であると考えられ、今回の知見から PROK2 は大腸癌における新規な血管新生増殖因子の 1 つと考えられた。近年切除不能進行大腸癌に対する血管新生因子に対する分子標的治療として、抗 VEGF 抗体や抗 EGF レセプター抗体があり、これらの治療薬は切除不能進行大腸癌患者の予後を改善している。しかしながら、治療成績はまだ十分とは言えず、新規治療が不可欠である。そこで SiRNA で PROK2 を抑制したところ、血管新生や腫瘍増殖の抑制が認められた。これらのことより高 PROK2 発現大腸癌において、PROK2 は新規治療のターゲットになり得る可能性が考えられた。

【結語】

大腸癌において Prokineticin 2 (PROK2)は新規の血管新生増殖因子として示唆られ、治療標的分子の 1 つとなることが考えられた。

備考 1 ※印の欄は、記入しないこと。

2 学位論文の要旨は、和文により研究の目的、方法、結果、考察、結論等の順に記載し、2,000 字程度でタイプ等で印字すること。

3 図表は、挿入しないこと。